

METHOD FOR MEASURING ACTIVATED HUMAN PROTEIN C

Patent number: JP3200066
Publication date: 1991-09-02
Inventor: KYODA TAKAHIRO; MAKI KOJI; INOUE KUNIYO
Applicant: TOSOH CORP
Classification:
- international: G01N33/577
- european:
Application number: JP19890338105 19891228
Priority number(s): JP19890338105 19891228

Report a data error here

Abstract of JP3200066

PURPOSE: To exactly and immunologically measure the human protein C in blood in a short period of time with a high sensitivity by utilizing the monoclonal antibody specific for activated human protein C and human protein C inhibitor, etc. **CONSTITUTION:** The monoclonal antibody immobilized to the solid phase which specifically recognizes the activated human protein C, a sample, the monoclonal antibody labeled to specifically recognize the human protein C inhibitor, and the monoclonal antibody labeled to specifically recognize human α_1 anti-trypsin are brought into contact and the label of the liberated or immobilized labeled antibody is directly or indirectly detected to determine the product of immune reaction. A sandwich method is used for this immunoassay. Any known methods may be adopted without limitations for the process for producing the monoclonal antibodies, the method for immobilizing the solid phase of the activated human protein C antibody, the method for labeling the human protein C inhibitor antibody, etc.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-200066

⑬ Int. Cl.¹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)9月2日

G 01 N 33/577

B

9015-2G

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 活性化ヒトプロテインCの測定方法

⑯ 特 願 平1-338105

⑰ 出 願 平1(1989)12月28日

⑱ 発 明 者 京 田 高 裕 神奈川県藤沢市湘南台4丁目26番地の5 サンパレス湘南306

⑲ 発 明 者 牧 浩 司 神奈川県海老名市河原口2398番地

⑳ 発 明 者 井 上 國 世 神奈川県相模原市相模大野7丁目37番17-402号

㉑ 出 願 人 東 ソ ー 株 式 会 社 山口県新南陽市大字富田4560番地

明 細 書

1. 発明の名称

活性化ヒトプロテインCの測定方法

2. 特許請求の範囲

試料中の活性化ヒトプロテインCを測定する方法において、

(a) ・活性化ヒトプロテインCを特異的に認識する、固相に固定化されたモノクローナル抗体(1)、

・試料、

・ヒトプロテインCインヒビターを特異的に認識するところの標識されたまたは標識されていないモノクローナル抗体(2)

・および、ヒトα₁アンチトリプシンを特異的に認識するところの標識されたまたは標識されていないモノクローナル抗体(3)

を接触させ

(b) (a)で標識されていないモノクローナル抗体

(2)・(3)を使用した場合には(a)で生じる免疫反応生成物、またはモノクローナル抗体(2)および(3)を特異的に認識する標識された抗体を接触させ、

(c) 遊離の又は固定化された標識化抗体の標識を、直接的または間接的に検出して免疫反応生成物を定量化する

ことを特徴とする活性化ヒトプロテインCの測定方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、活性化ヒトプロテインCに特異的なモノクローナル抗体、ヒトプロテインCインヒビターに特異的なモノクローナル抗体および、ヒトα₁アンチトリプシンに特異的なモノクローナル抗体を利用した活性化ヒトプロテインCの測定方法に関するものである。

(従来の技術)

血液凝固の制御反応の重要なものとして、プロ

テアーゼによる凝固因子の分解反応がある。この反応の主たるものは、プロテインCによるものである。

プロテインCはG1a含有凝固因子(ビタミンK依存性因子)の一つであり、循環血液中では2本鎖の前駆体として存在する。プロテインCはトロンビンにより高分子鎖のアミノ末端から12個のアミノ酸が遊離して活性化プロテインCとなる。これが、凝固系のV因子とⅧ因子を分解して失活させる。また、活性化プロテインCはプラスミノーゲンアクチベーターインヒビターの活性を抑制して線溶の亢進を起こす作用もある。

ヒトプロテインCインヒビターは、血液凝固抑制因子の活性化プロテインCの生理的阻害因子の一つである。精製されたプロテインCインヒビターは、試験管内では、X因子、トロンビン、XI因子、血漿カリクレイン、さらに線溶系プロテアーゼの組織プラスミノーゲンアクチベーターや尿由来プラスミノーゲンアクチベーター(ウロキナーゼ)を阻害する。しかし、通常プロテ

インCがほとんど活性化されない状態での血液凝固過程を試験管内で行うと、プロテインCインヒビター活性の低下はほとんど見られない。また、生体内でのプロテインCインヒビターの濃度の変動はプロテインC濃度の変動と良く一致することも知られている。これらのことより、プロテインCインヒビターは生体内ではプロテインCと最も良く反応するものと考えられる。

また、プロテインCに対する別のインヒビターとして、 α_1 アンチトリプシンが作用することが報告されている(M. J. Heeb & J. H. Griffin, J. Biol. Chem., 263, 11613, (1988))。

以上のことより、活性化プロテインCをそのインヒビターとの複合体として測定することにより、血液凝固阻止活性を検出することになる。また、前血拴状態とされる糖尿病や、DICの病理診断が可能になる。プロテインCの血中濃度は、健常人では約2~8 mg/lである。

その測定方法としては、プロテインCに対する

モノクローナル抗体を用いたEIAが現在行われているが、活性化されたプロテインCの測定としては厳格な意味で向いていない。

(発明が解決しようとする課題)

本発明の目的は、従来の方法よりも正確に、短時間に、高感度に活性化ヒトプロテインCを免疫学的に測定する方法を提供することにある。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは上記課題に関し鋭意検討した結果、本発明に到達した。

すなわち本発明は、試料中の活性化ヒトプロテインCを測定する方法において、

- (a) 活性化ヒトプロテインCを特異的に認識する、固相に固定化されたモノクローナル抗体(1)、
- ・試料、
- ・ヒトプロテインCインヒビターを特異的に認識するところの標識されたまたは標識されていないモノクローナル抗体(2)
- ・および、ヒト α_1 アンチトリプシンを特異

的に認識するところの標識されたまたは標識されていないモノクローナル抗体(3)

を接触させ

- (b) (a)で標識されていないモノクローナル抗体(2)、(3)を使用した場合には(a)で生じる免疫反応生成物、またはモノクローナル抗体(2)および(3)を特異的に認識する標識された抗体を接触させ、

- (c) 遊離の又は固定化された標識化抗体の標識を、直接的または間接的に検出して免疫反応生成物を定量化する

ことを特徴とする活性化ヒトプロテインCの測定方法である。

本発明のヒトプロテインCインヒビター測定法は、ヒトプロテインCに特異的なモノクローナル抗体、ヒトプロテインCインヒビターに特異的なモノクローナル抗体および、ヒト α_1 アンチトリプシンに特異的なモノクローナル抗体を利用した血液中のヒトプロテインCの免疫学的測定法にあり、以下その詳細について説明する。

本発明方法において、用いられるモノクローナル抗体は、周知自体公知である方法 (G. Kohler & C. Milstein, Nature, 256, 495, (1975)) に準じて製造することができる。

以上の方法により、ヒトプロテインC、ヒトプロテインCインヒビター又はヒト α_1 アンチトリプシンを特異的に認識する複数種のモノクローナル抗体を得た。それぞれの抗体の結合定数は、 $10^7 \sim 10^{11} M^{-1}$ の範囲内であった。これらのモノクローナル抗体を使って、ヒトプロテインCを定量的に測定できるサンドイッチ法による免疫学的測定方法が可能となった。

本発明方法に用いられる抗活性化ヒトプロテインC抗体を固相に固定化する方法は、公知の方法を採用でき、固相としては例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネート、セファロース粒子、ラテックス、アガロース、セルロース、ポリメタアクリレートなどが使用される。

標識物質は上記物質に何ら限定されるべきものではない。

測定に使用される試薬は、上記物質以外にも、基質、溶解剤、緩衝剤、洗浄剤、反応停止剤等の公知の試薬が用いられる。

試料、抗体の添加順序には特に限定はない。

最終的に生成した免疫反応生成物、すなわち固定化された標識化抗体の標識又は遊離の抗体の標識を検出し、定量すればよい。

(作用)

活性化ヒトプロテインCは、試料中に共存するヒトプロテインCインヒビターまたはヒト α_1 アンチトリプシンと複合体を形成している。従ってこの複合体を定量することで、活性化ヒトプロテインCを間接的に定量することができる。ヒトプロテインCインヒビターは、ヒトプロテインCへの結合力は強いが、例えば血中での存在量が少く、一方、ヒト α_1 アンチトリプシンはヒトプロテインCへの結合力は弱い、血中では多量に存在する。そこで、活性化ヒトプロテインC-ヒトプロ

また抗ヒトプロテインCインヒビター抗体および抗ヒト α_1 アンチトリプシン抗体を標識する場合、標識化の方法とその検出方法もなんら限定されるものでなく、公知の方法により標識化および検出することができる。抗ヒトプロテインCインヒビター抗体および抗ヒト α_1 アンチトリプシン抗体が標識されていないものを用いる場合には、これらの抗体又は免疫反応生成物を特異的に認識する標識された抗体を用いる。

標識として間接的に検出されるもの、例えば酵素を用いる場合、標識物質としては例えば、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、 β -グルクロニダーゼなどの酵素が使われる。また直接的に検出される標識、例えば放射性物質としては、 3H 、 ^{125}I 、または ^{131}I 等が、蛍光物質を使用する方法としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンチオシアネート、テトラローダミンイソチオシアネート等が常法によりモノクローナル抗体に結合される。しかしながら、

テインCインヒビター複合体及び活性化ヒトプロテインC-ヒト α_1 アンチトリプシン複合体の両方を測定することで、より厳密に活性化ヒトプロテインCを測定することができる。従って本発明方法では、この複合体を抗活性化ヒトプロテインC抗体及び抗ヒトプロテインCインヒビター抗体、又は抗活性化ヒトプロテインC抗体及び抗ヒト α_1 アンチトリプシン抗体でサンドイッチし、測定するのである。

尚、試料中にヒトプロテインCインヒビターと α_1 アンチトリプシンが存在しない場合は、外部から添加して複合体を形成させてから本発明法により測定すべきである。しかし、試料がヒト血液であれば、両者ともその中に含まれているので、外部から添加する必要はなく、そういったことから試料はヒト血液であることが好ましい。

(発明の効果)

以上の説明から明らかなように本発明によれば、

(1) 血液中の活性化ヒトプロテインC濃度は、 $1 \sim 200 ng/ml$ の範囲内で測定することが

でき、

(2) 従来法に比べて極めて簡便な操作で短時間に、かつより厳密な意味での活性化ヒトプロテインCを感度よく多数の検体の測定が可能である。

(実施例)

以下に本発明の詳細な実施例を説明する。しかし、本発明はこれら実施例にのみに限定されるものではない。

(モノクローナル抗体の調製)

(A) 抗原感作動物細胞の調製

ヒトプロテインC、ヒトプロテインCインヒビター、又はヒト α_1 アンチトリプシンを抗原としてB α 1b/cマウス(♀)をそれぞれ免疫した。免疫は、マウスの腹腔にフロイントの完全アジュバントと抗原100 μ g/匹とを乳化させた血液100 μ lを投与した。2週間後に追加免疫として抗原100 μ g/匹をフロイントの不完全アジュバントと乳化させたもの100 μ lをマウス腹腔に投与した。1週間後最終免疫として抗原100 μ g/匹をリン酸緩衝化生理食塩水

(0.85%NaCl含有0.01%リン酸緩衝液、pH7.2(以下PBS))に溶解したもの100 μ lを腹腔内に投与した。3日後この処置マウスの脾臓を無菌的に取出した。15%子牛胎児血清(以下15%FCSと省略する)を含むDMEM10mlを注射器で吸い取り27ゲージの注射針をつけた。脾臓を水冷しておいたディッシュに入れ、注射針で数か所穴をあけた。注射針を差し込み遠流し脾臓細胞をディッシュに流出させた。流出液をナイロンメッシュで濾過し遠心チューブに入れ、1000rpmで10分間遠心分離して上澄をすてた。細胞ペレット中の赤血球を0.15M塩化アンモニウム溶液(1mMエチレンジアミン4酢酸-2ナトリウム塩(以下EDTAと省略する)を含む0.01M炭酸緩衝液、pH7.2)で溶血させ遠心分離し、さらに細胞ペレットをDMEMで2回同様に遠心洗浄して脾細胞とした。

(B) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としてはB α 1b/cマウス由来の

8-アザグアニン耐性株として、SP2/O-Ag14(以下SP2/Oと省略する)を使用した。細胞融合を行う1週間前まで20 μ g/mlの8-アザグアニン、15%FCSを含むDMEMで培養し、その後細胞融合日まで15%FCSを含むDMEMを使用した。細胞融合直前に、SP2/Oは無菌的にDMEMで1000rpmで10分間遠心洗浄を2回繰り返して調製した。

(C) 細胞融合

上記(A)項で調製した脾臓細胞と上記(B)項で調製した骨髓腫細胞を5:1の割合で混合遠心(1000rpm, 10分)し細胞ペレットを集めた。遠心チューブを軽くたたいて細胞ペレットを壁面にうすく広げた。その中に37℃に暖めておいた50%PEG(MERK社製ポリエチレングリコール4000)を含むDMEM溶液0.5mlを遠心チューブを回しながら少しずつ滴下した。1分間ゆっくりと遠心チューブを回転させ混合した後、30秒に1mlの割合で遠心チューブを回転しながら37℃に加温しておいたD

MEMを10回加えた。つぎにFCSを2mlゆっくりと入れ、1000rpm, 10分間遠心した。細胞ペレットを15%FCSと 1×10^{-4} Mヒポキサンチン、 4×10^{-7} Mアミノプテリン、 1.6×10^{-5} Mチミジンを含むDMEM(以下HAT培地と省略する)で2回遠心洗浄

(1000rpm, 10分間)した。この培養液を96ウエルプレート(Falcon#3042)に 5×10^3 細胞個/ウエルになるように200 μ lずつ分注した。3日目ごとにHAT培地を100 μ l/ウエル交換した。3週間後からは、 1×10^{-4} Mヒポキサンチン、 1.6×10^{-5} Mチミジンと15%FCSを含むDMEM(以下HT培地と省略する)を培地交換に用いた。

(D) ハイブリドーマの選択

96ウエルプレートに細胞コロニーが認められる10日目前後から固相酵素免疫測定法を行い、培養上清に特異的抗体が存在するかどうか調べた。

96ウエルプレート平底(インターメッド社製)に、各抗原2 μ g/mlを50 μ l/ウエル分注

し、37℃で1.5時間静置する。ウエルに残っている溶液を除去し、PBSに0.04% Tween (Tween) - 20を含んだ溶液（以下PBS-T）で3回洗浄した後、0.1%ウシ血清アルブミン（以下BSA）を溶解したPBS-T溶液300 μ lを各ウエルに加えて、37℃で1.5時間ブロッキング処理した。つぎに各ウエルに上記培養上清を100 μ lずつ分注し37℃で1.5時間静置した。これらのウエルをPBS-T溶液で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ラビット抗マウスIgG抗体（ジャクソン社製）4000倍希釈を50 μ l/ウエルずつ分注し、37℃で1.5時間静置した。PBS-T溶液で3回洗浄したのち、基質溶液（1.2% 2,2'-アジノジ（3-エチルベンズチアゾリン硫酸）-ジアンモニウム塩（ABTS）及び0.01%過酸化水素（H₂O₂）を含む0.1Mクエン酸緩衝液（pH 5.1））を各ウエルに100 μ l添加した。30分間室温で放置し、200 mM シュウ酸溶液を100 μ lを加えて酵素反応

を停止させた。415 nmでの吸光度を測定し、酵素活性が認められたウエルに特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが存在することがわかる。以上のようにして、抗体価の高い抗体産生ハイブリドーマを取得した。

(E) コンデシニングメデウムの調製

26ゲージの注射針をつけた注射器に10 mlの冷蔵しておいた0.34 M サッカロース溶液を吸い取った。Balb/cマウス（ μ ）を脊髄脱臼させ、無菌的に腹腔内に上記溶液を注入した。注入後5分以内に左側腹部に18ゲージの注射針をつけ氷冷しておいた注射器にて腹腔内溶液を回収した。氷冷しておいた遠心チューブに上記回収液を流し込み、1000 rpmで5分間遠心分離した。遠心後上清を廃棄し、細胞ペレットに15% FCS - DMEMを加え脱栓しデッシュに入れた。37℃、5%炭酸ガス湿度、95%湿度で一晩培養した。培養上清を集め、0.22 μ mのメンブレンフィルターで濾過し、これをコンデシニングメデウムとした。

(F) クローニング

抗体産生を認めるハイブリドーマについて限界希釈法を用いて単一クローンにした。上記(E)項で作製したコンデシニングメデウムを1 ml含むHAT培地20 mlを用意した。クローニングしたいハイブリドーマ細胞を各ウエルに1個になるように上記培養液中に調整し、200 μ l/ウエルずつ96ウエルプレート（Falcon #3042）に分注した。培養10日目前後から細胞コロニーが認められるウエルについて、上記(D)項に記載した固相酵素免疫測定法に準じて抗体産生ハイブリドーマを選別し、さらに再度クローニングを繰り返して単一ハイブリドーマを樹立した。最終的に27クローンのハイブリドーマを確立した。

(G) 抗体の精製

Balb/cマウス（ μ ）6~10週令の腹腔にプリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン）を0.5 ml/匹投与した。2週間後上記(F)項で得られた各特異的抗体産生

ハイブリドーマ株をマウス腹腔内に各クローンについて 2×10^6 細胞個/匹移植した。10日目前後に生成した腹水を、18ゲージの注射針を腹腔に差し込み、1/20量の0.2 M EDTAをいれた遠心チューブに滴下させた。遠心チューブを4000 rpmで10分間遠心し、上清を集めた。採取した上清を50%硫酸アンモニウム沈殿分画法にしたがって粗精製し、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS溶液に透析後、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過をおこない精製した。メルカプトエタノール還元下での12% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で1本の重鎖と1本の軽鎖の2本のバンドになったことで抗体の純度を確認した。

(酵素標識法によるヒトプロテインCの測定)

(A) 抗ヒトプロテインC抗体の固定化

未処理マイクロタイタープレート（96ウエル・マルチプレート、インターメッド社製）の各ウエルに0.1 M炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.6）に溶解した3 μ g/mlのマウス由来の

抗ヒトプロテインC抗体の溶液200 μ lを加えて、4℃で一夜インキュベートした。次に、各ウェルの溶液を除去し、PBS-Tで3回洗浄した後、0.1%BSAを溶解したPBS-T溶液300 μ lを各ウェルに加えて、4℃でブロッキング処理しそのまま保存した。

(B) 西洋ワサビペルオキシダーゼ(以下HRP)標識抗体の調製: 0.3M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.1)に溶解したHRP溶液(5mg/ml)に1% 1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンのエタノール溶液0.1mlを加え、室温にて1時間反応させた。その溶液に0.06M過ヨウ素酸ナトリウム1.0mlを添加し30分反応させた。未反応の過ヨウ素酸ナトリウムを0.16Mのエチレングリコール1.0mlを加えて除去した後、0.01M炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.5)で透析した。次に、マウス由来抗ヒトプロテインCインヒビター・モノクローナル抗体5mgを加えて5~6時間反応させた。水素化ホウ素ナトリウム5mgを添加して4℃で中

一夜放置した。この後、未反応の水素化ホウ素ナトリウムを除去するため、0.85%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)に対して4℃で一夜透析しながら透析した。上記反応物をTSK-ゲルG-3000SW(東ソー株式会社製、商品名)を用いて高速液体クロマトグラフィーにて精製し、HRP標識抗体とした。同様に、抗ヒト α_1 アンチトリプシン抗体の標識抗体も同様に調製した。

(C) 血液中のヒトプロテインCの定量

本実施例中の(A)で記述した方法で作製したマイクロタイタープレートを用意し、PBS-T溶液で洗浄した後、既知量の活性化ヒトプロテインC・インヒビター複合体を含む標準血液を各ウェルにそれぞれ20 μ l加えた。つぎに本実施例(B)で得た2つのHRP標識抗体をPBS-T溶液で希釈し、各ウェルに100 μ lずつ添加した。そのまま室温で3時間インキュベートした後、溶液を除去しPBS-T溶液で3回洗浄

した。それに、1.2% ABTS及び0.01%過酸化水素(H_2O_2)を含有する0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.1)から成る基質溶液を各ウェルに200 μ l添加し、室温で30分間酵素反応させた後、200mMシュウ酸溶液を100 μ l加えて酵素反応を停止させた。上記マイクロタイタープレートを各ウェルについて、波長415nm、対照波長492nmの吸光強度を自動マイクロタイタープレートリーダー(東ソー株式会社製、MPR-A4、商品名)で測定した。結果を表1に示す。

表1

プロテインC ・インヒビター 複合体 (ng/ml)	吸光度
0.8	0.04
1.6	0.06
3.2	0.11
6.3	0.21
12.5	0.36
25	0.57
50	0.92
100	1.28
200	1.57

表1から明らかなように、試料中のヒトプロテインCは1~200ng/mlの範囲で定量できることが確認された。